

TIPIZZAZIONE FENOTIPICA DEI CEPPI DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILLINO RESISTENTI E METICILLINO SENSIBILI ISOLATI DA SUINO: SENSIBILITA' AGLI ANTIMICROBICI, BIOTIPIZZAZIONE E STUDIO DEL BIOFILM

BIOFILM FORMATION, BIOTYPING AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING IN METICILLIN RESISTENT AND IN METICILLIN SENSITIVE STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS ISOLATED FROM SWINE

COCCHI M*., DI GIUSTO T.*, USTULIN M.**, DEOTTO S.**, DRIGO I.***, CONEDERA G.**, VIO D.**

* *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Udine*

** *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione di Pordenone*

*** *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Treviso*

Parole chiave: *Staphylococcus aureus*, biofilm, biotipo, suino

Key words: Biofilm formation, *Staphylococcus aureus*, biotyping, swine

Riassunto. *Staphylococcus aureus* (SA) è un microrganismo che può causare patologie di diversa gravità sia nell'uomo che negli animali. La virulenza è legata a diversi fattori: produzione di tossine, fattori extracellulari ed enzimi che permettono al microrganismo di resistere ad una o più classi di antimicrobici. In particolare, la meticillina resistenza, valutata in laboratorio tramite l'utilizzo dell'oxacillina, permette di differenziare ceppi MRSA, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* e ceppi MSSA, *methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*. I ceppi MRSA sono dotati di maggiore virulenza e resistenza a molte classi di antimicrobici. Scopo del presente lavoro è stato studiare ceppi MRSA e MSSA isolati dal suino caratterizzandoli fenotipicamente con il test di sensibilità agli antimicrobici, lo studio del biotipo e della formazione del biofilm. I risultati hanno mostrato un'elevata presenza di antibiotico resistenza in tutti i ceppi testati, anche se con percentuale maggiore nei ceppi MRSA. Il biotipo mixed CV-C era quello maggiormente rappresentato in entrambe le categorie, anche se in percentuale maggiore nei MRSA. Il biotipo bovino era inoltre presente solo fra i ceppi MRSA. Nessun ceppo formava il biofilm. La caratterizzazione fenotipica degli isolati ha permesso di ottenere informazioni che dovranno comunque essere approfondite con successive indagini, in particolare di tipo molecolare (presenza di geni codificanti per il biofilm).

Abstract. *Staphylococcus aureus* (SA), is a common cause of infections both in humans and in animals. The virulence of SA is associated with its ability to produce toxins, other extracellular factors and to develop resistance to some drugs. In particular the resistance to methicillin constitutes a public health concern. Based on the oxacillin test, the SA strains were divided in resistant strains (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) and susceptible strains (methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, MSSA). The MRSA group includes more virulent and multidrug resistant strains. In this study, 44 SA strains isolated from swine were submitted to oxacillin test in order to distinguish MRSA and MSSA. Subsequently, a phenotypic characterization, evaluating the slime production, the biotype and the susceptibility to some molecules was performed. Results indicate that 10/44 (23%) strains belonged to MRSA. The mixed CV-C biotype was the most frequently identified both in MRSA and in MSSA strains,

while one MRSA belonged to bovine biotype. High prevalence of resistance against penicillin, ampicillin and tetracycline was found, but in MRSA strains the value was much higher. CRA test revealed that no strains were positive for biofilm formation. This study allowed a phenotypic analysis of SA strains isolated from swine: others studies (genetic analysis) are necessary in order to establish the potential ability to form biofilm.

INTRODUZIONE

S. aureus è un microrganismo commensale presente normalmente sulla cute e sulle mucose dell'uomo e degli animali; in presenza di fattori predisponenti può dare infezioni di diversa gravità che possono colpire differenti distretti organici e causare batteriemia. Nel suino *S. aureus* è responsabile di mastite, vaginite, metrite e formazione di ascessi in seguito a fenomeni batteriomici (B. E. Straw, 2006). Numerose sono le sostanze extracellulari elaborate dagli stafilococchi, fra le quali si ricordano coagulasi, ialuronidasi, stafilochinasi ed emolisine che permettono al microrganismo di svolgere la sua azione patogena. La presenza inoltre di enzimi quali la b-lattamasi extracellulare rende il microrganismo resistente a talune classi di beta lattamici (Farina, Scatozza, 1998): ceppi di *S. aureus* hanno mostrato un elevato grado di resistenza poco tempo dopo l'introduzione della penicillina a fini terapeutici. Analogamente, il primo caso di isolamento di ceppi di *S. aureus* resistente alla meticillina fu identificato nel 1961 solo dopo due anni dalla introduzione della meticillina nella pratica clinica. I ceppi di *S. aureus* che presentano resistenza alla meticillina sono definiti methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA), mentre quelli sensibili alla molecola sono chiamati methicillin-susceptible Staphylococcus aureus (MSSA). I ceppi MRSA presentano elevata virulenza e resistenza a diverse classi di antimicrobici, rendendo l'approccio terapeutico difficoltoso. Nell'uomo ad esempio la batteriemia sostenuta da ceppi MRSA causa una mortalità più elevata di quella causata da ceppi MSSA (Cosgrove S.E. *et al.*, 2003). Nonostante diversi studi sottolineino come MRSA sia soprattutto un patogeno umano, recentemente la tipizzazione molecolare ha messo in evidenza che alcuni cloni sono ampiamente diffusi fra uomo e animale (Hunter *et al.*, 2010). Studi condotti in alcuni paesi europei (Paesi Bassi, Danimarca, Belgio) hanno dimostrato la presenza e in taluni casi una elevata incidenza di ceppi MRSA nei suini e negli addetti di questo comparto zootecnico, rendendo questi ceppi di grande interesse per la sanità pubblica (Van Den Broek I.V.F. *et al.*, 2008). Inoltre, secondo una recente indagine condotta in Italia da Battisti *et al* (2010) il suino può rappresentare il reservoir di ceppi meticillino resistenti.

Diversi sono gli approcci utilizzati in laboratorio per caratterizzare i ceppi di *S. aureus*, sia fenotipici che molecolari. Nel settore cunicolo, ad esempio, grande attenzione è stata rivolta allo studio dei ceppi ipervirulenti di *S. aureus* ed allo sviluppo di sistemi diagnostici che ne permettono l'individuazione al fine di una eradicazione dello stesso dagli allevamenti dove può causare gravi perdite economiche (Agnoletti, 2009). Questi ceppi, comunemente indicati con l'acronimo HVSA (High virulence *Staphylococcus aureus*), si differenzerebbero dai ceppi a bassa virulenza (LVSA: Low virulence *S. aureus*) per una maggiore adesività ai tessuti dell'ospite, probabilmente legata alla presenza di specifiche adesine di superficie (MSCRAMMS, *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) (Vancraeynest *et al.*, 2006). Per la caratterizzazione dei ceppi di *S. aureus* sono stati utilizzati metodi di caratterizzazione fenotipica, come ad esempio la biotipizzazione, lo studio dell'antibiotico resistenza e della formazione del biofilm. Recentemente, una più approfondita conoscenza è stata offerta dall'utilizzo di tecniche biomolecolari, PFGE ad esempio, con l'analisi di *marker* genetici di virulenza.

Scopo del presente lavoro è stato quello di tipizzare fenotipicamente ceppi MRSA e MSSA di *S. aureus* meticillino sensibili e ceppi meticillino resistenti studiandone il profilo di antibiotico resistenza, biotipo e presenza del biofilm.

MATERIALI E METODI

44 ceppi di *S. aureus* isolati dal suino, previamente identificati e facenti parte della ceppoteca di laboratorio sono stati sottoposti alla ricerca della meticillina resistenza. A tal fine è stato utilizzato il test dell'agar diffusione, introducendo un dischetto di oxacillina (OXA, 10 mg – Becton Dickinson -), secondo quanto descritto dal Clinical and laboratory standards institute (CLSI). I ceppi resistenti sono stati confermati con l'analisi molecolare per la ricerca del gene *mecA*, eseguita secondo quanto descritto da Louie *et al*, 2002. Il DNA è stato estratto utilizzando il kit commerciale "GeneElute Bacterial genomic DNA kit" (Sigma-Aldrich). Tutti I ceppi ottenuti sono stati successivamente sottoposti ai seguenti tests di caratterizzazione fenotipica:

- Test di sensibilità agli antimicrobici. E' stato condotto usando il metodo dell'agar diffusione, in accordo con le linee guida del CLSI. I principi attivi utilizzati sono stati i seguenti: penicillina (P, 10 mg – Becton Dickinson-), ampicillina (AMP, 10 mg – Becton Dickinson -), tetraciclina (TE, 30 mg – Oxoid -), sulfametoxazolo+trimethopim (SXT, 1,25 mg – Oxoid -). Gli isolati sono stati classificati in sensibile, intermedio, resistente, in accordo con quanto riportato dal CLSI.

- Analisi della formazione del biofilm. Detta indagine è stata effettuata tramite l'utilizzo del Congo Red Agar (CRA). Le piastre di CRA sono state allestite addizionando 0.8 g di rosso Congo (Sigma) e 36 g di saccarosio (Sigma) a 11 g di Brain Heart Infusion agar (Oxoid). Le piastre sono state incubate per 24 ore a 37± 2°C, in condizioni di aerobiosi e successivamente poste, *overnight*, a temperatura ambiente per ulteriori 24-48 ore. La valutazione delle colonie si è basata su un'evidenza colorimetrica: le colonie producenti biofilm apparivano nere/nero-grigie/grigie su fondo rosso, mentre le colonie non producenti il biofilm apparivano rosa/rosso su fondo scuro. Quali controlli di reazione sono stati associati i seguenti ceppi: controllo positivo: *S. epidermidis* ATCC 35984 e controllo negativo: *S. epidermidis* ATCC 12228.

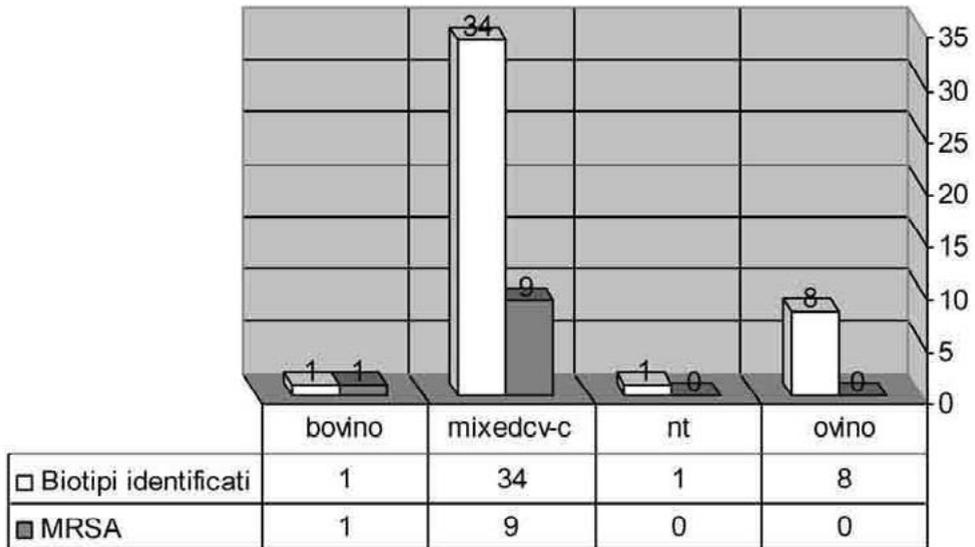
- Biotipizzazione. E' stata eseguita secondo quanto descritto da Devriese (1984). Partendo da una colonia di *S. aureus* sono state allestite le seguenti prove: test per la beta-emolisi, stafiloquinasasi, coagulazione del plasma bovino, e la reazione al cristal violetto. In tabella 1 sono sintetizzate i criteri interpretativi utilizzati nelle reazioni descritte.

Tabella 1. Criteri interpretativi per l'assegnazione del biotipo

BIOTIPO	β-EMOLISI	CRISTALVIOLETTO	STAFILOCHINASI	COAGULAZIONE DEL PLASMA BOVINO
UMANO	+/-	C	+	-
BOVINO	+	A	-	+
OVINO	+	C	-	+
AVIARIO	-	A	-	-
MIXED CV-C	+	C	-	-
MIXED CV-A	+	A	-	-
	+	A	+	-
	-	A	+	-
NON TIPIZZABILE	-	C	-	-

Legenda

+, presenza; - assenza; C, cristal-violetto tipo C; A, cristal-violetto tipo A



RISULTATI

Meticillino - resistenza. 10/44 (23%) ceppi presentavano resistenza all'oxacillina; il dato fenotipico è stato confermato dall'analisi molecolare.

- Sensibilità agli antimicrobici. Fra i ceppi MSSA, 31/34 (91,18%) erano resistenti a P, AMP, Te, mentre 6/34 (17,65%) erano resistenti a SXT. 28/34 (82,35%) erano resistenti a P+AMP+Te, mentre 6/34 (17,65%) erano resistenti a P+AMP+TE+SXT. Tutti i ceppi MRSA erano resistenti a penicillina, ampicillina, e tetraciclina, e di questi 3 (30%) risultavano resistenti anche al SXT. Fra i ceppi MRSA, 10/10 erano resistenti a P, AMP, Te, 3/10 (30%) erano resistenti a SXT e 2/10 intermedi alla stessa molecola. Tutti i ceppi MRSA erano resistenti a P+AMP+TE (100%), mentre 3/10 (30%) erano resistenti a P+AMP+TE+SXT.

- Analisi della formazione del biofilm. Tutti i ceppi hanno dato esito negativo alla ricerca del biofilm.

- Biotipizzazione. La biotipizzazione ha dato I risultati descritti in figura 3.

Come emerge dall'analisi eseguita, fra i ceppi di *S. aureus* identificati nel suino 34/44 (77,27%) appartenevano al biotipo mixed CV-C e 8/44 (18,18%) al biotipo ovino. I due restanti ceppi erano biotipo bovino (1/44) e non tipizzabile, NT (1/44). In particolare, fra i ceppi MRSA, 1/10 (10%) apparteneva al biotipo bovino e 9/10 (90%) a quello mixed CV_C. Nessun ceppo MRSA apparteneva ai biotipi ovino e NT. Fra i ceppi MSSA 25/34 (73,53%) erano biotipo mixed CV_C, mentre 8/34 (23,53%) erano ovino e 1/34 (2,94%) risultava non tipizzabile. Nessun ceppo MSSA apparteneva al biotipo bovino.

DISCUSSIONE

In questo studio sono stati sottoposti ad indagine fenotipica 10 ceppi MRSA e 34 ceppi MSSA. Fra i ceppi studiati emerge una elevata percentuale di ceppi MRSA resistenti sia

alle singole molecole testate che a più classi di antimicrobici, contemporaneamente, rispetto ai ceppi MSSA. L'analisi del biotipo, inoltre, evidenzia che fra i ceppi suini quello più diffuso è il biotipo mixed CV-C. Tutti i ceppi MRSA caratterizzati dal biotipo mixed CV_C risultano resistenti a P, AMP, TE e 22.22% anche a SXT. Diversamente nei ceppi MSSA appartenenti al biotipo mixed CV_C, la resistenza a P e AMP è pari al 96%, mentre è pari all'88% per la TE e al 4% nel caso del sulfamidico potenziato. Analogamente, l'analisi della multiresistenza evidenzia valori percentualmente più elevati nei ceppi MRSA biotipo mixed CV-C rispetto ai ceppi MSSA. Il biotipo mixed CV-C è stato ampiamente studiato in altre specie animali, ad esempio nel coniglio. Secondo alcuni autori, infatti, la presenza di adesine di superficie (MSCRAMMs) in grado di amplificare la contagiosità dell'infezione (Vancreaynest *et al.*, 2006) caratterizzerebbe i ceppi HV-SA appartenenti al biotipo Mixed CV-C (Agnoletti *et al.*, 2007). I risultati delle analisi condotti su ceppi di *S. aureus* isolati da coniglio, evidenziano risultati non concordi fra i diversi gruppi di lavoro, riguardo una maggiore frequenza di taluni geni (geni *bbp selm* e della sequenza *flank*) nei ceppi appartenenti al biotipo mixed CV-C rispetto ai ceppi appartenenti ad altri biotipi. (Agnoletti *et al.*, 2009; Vancreaynest *et al.*, 2007). Queste differenze sottolineano da un lato un probabile ruolo nelle caratteristiche di virulenza di *S. aureus*, anche se la contemporanea presenza dei geni non può costituire un *marker* esclusivo di patogenicità.

Per quanto riguarda l'analisi della formazione del biofilm, l'utilizzo del CRA test ha permesso di ottenere informazioni di tipo qualitativo sulla presenza del biofilm nel ceppo batterico in esame. Secondo Amorena *et al* (1999) i batteri presenti nel biofilm risultano maggiormente resistenti agli agenti antimicrobici rispetto ai batteri della stessa specie in coltura libera. Lo studio del biofilm costituisce elemento importante nell'analisi della virulenza dei ceppi di SA, come ad esempio hanno dimostrato studi condotti su ceppi identificati da latte mastitico bovino, in cui la formazione del biofilm, consentendo l'adesione dei microrganismi alla superficie mucosale, determina una persistenza dell'infezione stessa e una aumentata resistenza del microrganismo agli antimicrobici (Melchior MB *et al.*, 2006). La formazione del biofilm viene regolata a livello genetico dall'*intracellular adesion (ica) locus*: esso controlla la sintesi di una molecola di natura polisaccaridica, *polysaccharide intercellular adhesin*, PIA, che permette l'adesione intercellulare ((Mack D. *et al.*, 1996). L'*ica locus* è costituito dai geni *icaADBC* e codifica proteine che mediano la sintesi di PIA nei ceppi di SA. L'analisi fenotipica condotta evidenzia la presenza di soli ceppi non formanti il biofilm. L'assenza di espressione del fattore potrebbe essere imputato a differenti elementi: Baselga *et al.* (1993) hanno dimostrato come l'espressione fenotipica del biofilm risenta delle condizioni di coltivazione del microrganismo, come ad esempio l'atmosfera di incubazione. Arciola *et al* (2002), inoltre, descrivono ceppi fenotipicamente "biofilm negativi, genotipicamente positivi", in cui la mancata espressione genica è associata ad una mutazione puntiforme o a fattori interferenti l'espressione genica stessa. L'espressione del *locus* genico è infatti, altamente variabile, influenzato ad esempio da riarrangiamenti genomici.

CONCLUSIONI

Lo studio condotto ha permesso di valutare il pattern fenotipico in ceppi di SA isolati da suini; a tal fine sono stati scelti come markers fenotipici lo studio dell'antibiotico resistenza, la produzione del biofilm e la determinazione del biotipo. Per diverso tempo, *S. aureus* è stato caratterizzato utilizzando solamente metodi basati sullo studio del fenotipo, p.e. tipizzazione fagica, biotipo e pattern di antibiotico resistenza. Questi metodi presentano limiti quali un basso potere discriminatorio e una modesta riproducibilità, imputabile alla mancata espressione del tratto in esame. Attualmente, i ceppi di *S. aureus* vengono perciò tipizzati con l'ausilio

di metodi biomolecolari, p.e. PFGE, caratterizzate da elevata riproducibilità e da elevato potere discriminatorio. Emerge quindi la necessità di migliorare i metodi di indagine per la caratterizzazione di *S. aureus*, utilizzando metodi biomolecolari, dotati di maggiore sensibilità e specificità rispetto a quelli fenotipici. Si sottolinea che tuttavia, nonostante i limiti sopracitati, hanno permesso di differenziare ceppi MSSA e MRSA del suino in termini di biotipo e biotipo/resistenza agli antimicrobici.

BIBLIOGRAFIA

Amorena B., Gracia E., Monzon M., Leiva J., Oteiza C., Perez M., Alabart J.L., Hernandez-Yago J. (1999). Antibiotic susceptibility for *Staphylococcus aureus* in biofilm developed in vitro. *J Antimicrob. Chemother.* 44: 43-55.

Arciola C.R., Campoccia D., Gamberini S., Cervellati M., Donati E., Montanari L. (2002). Detection of slime production by means of an optimised Congo Red agar plates based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolate genotyped for ica locus. *Biomaterials*. 23: 4233-4239.

Baselga R., Albizu I., De La Cruz M., del Cacho E., Barberan M., Amorena B. (1993). Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implication in colonization and virulence. *Infect Immun.* 61: 4857-4862.

Battisti A, Franco A, Merialdi G, Hasman H, Iurescia M, Lorenzetti R, Feltrin F, Zini M, Aarestrup FM. (2010). "Heterogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italian pig finishing holdings." *Vet Microbiol.* 19:142 (3-4):361-366.

B. E. Straw, J. J. Zimmermann, S. D'Allaire, D. J. Taylor (2006). „Diseases of swine”, 9th Edition, Ames (Iowa Usa) Blackwell Publishing.

Devriese L.A. (1984). "A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species". *J Applied Microbiol.* 56:215-220.

Drigo I., Bacchin C., Amato S., Bano L., Bonci M., Dalla Pozza M.C., Deotto S., Ferro T., Guolo A., Marcon B., Agnoletti F. (2009). "Impiego della PFGE per lo studio dell'epidemiologia delle infezioni da *Staphylococcus aureus* nel coniglio" Giornate di conigliocultura ASIC 2009, 2-3 aprile 2009. Forlì, 61-63.

Cosgrove S.E., Sakoulas G., Perencevich E. N., Schwaber M. J., Karchmer A. W., Carmeli Y. (2003) "Comparison of Mortality Associated with Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Meta-analysis". *Clinical Infectious Diseases.* 36:53-9

Clinical and laboratory standards institute (CLSI). M31-A3. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Vol 28. n 8.

Costerton J.w., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284. 1318-1322.

Farina R., Scatozza F. (1998). "Trattato di malattie infettive degli animali" Vol 1. Seconda edizione, Utet; Torino.

Hunter P.A., Dawson S., French GL et al. (2010). "Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies. J Antimicrob Chemother. 65:13-17.

Vancraeynest D., Haesebrouck, F., Deplano, A., Denis, O., Godard, C., Wildemaewe, C., Hermans, K., (2006). "International dissemination of a high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* clone". J. Vet. Med. 53: 418-422.

Vancraeynest, D., Haesebrouck, F., Hermans, K. (2007). Multiplex PCR assay for the detection of high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* strains. Vet. Microbiol. 121:368-372.

VAN Den Broek IV, Van Cleef BA, Haenen A, Broens EM, Van Der Wolf PJ, Van Den Broek MJ, Huijsdens XW, Kluytmans JA, Van De Giessen AW, Tiemersma EW. (2009) "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in people living and working in pig farms." Epidemiol Infect. 137(5):700-708.

Louie L., Goodfellow, J., Mathieu P., Glatt, A., Louie M., Simor, AE, (2002). Rapid detection of methicillin resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. J Clin Microbiol, 40(8): 2786-2790.

Mack D., Haeder M., Siemssen N., Laufs R. (1996). Association by biofilm production of coagulase negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesine. J Infect Dis 174 (4). 881-884.

Melchior M. B., Gremmels J.F., Gaastra W. (2006). Comparative assesment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. J Vet Med B. 53. 326-332.